

FACOLTA' DI FARMACIA
CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE
Tesi di Laurea: RUOLO DELLA CHINASI GRK2 NELLA
DESENSITIZZAZIONE DEL RECETTORE GPR17

Relatore: Dott.ssa Maria Letizia Trincavelli
Dott.ssa Simona Daniele

Candidata: Elisa Zappelli

Settore disciplinare biochimico

Il GPR17 è un recettore accoppiato a proteine G (GPCR), strutturalmente e filogeneticamente correlato ai recettori purinergici (P2Y) e ai recettori per i leucotrieni (CysLT). Questo GPCR è un recettore dualistico, che risponde a due classi di molecole: ai ligandi uridinici (quali UDP, UDP-glucosio) e ai cisteinil leucotrieni (LTC₄, LTD₄, LTE₄), con una affinità nell'ordine del micromolare e nanomolare, rispettivamente.

In condizioni fisiologiche, il GPR17 è normalmente presente a livello del sistema nervoso centrale in neuroni e in un sottoinsieme di cellule precursori degli oligodendrociti (OPC).

In condizioni patologiche, quali ischemia cerebrale e lesioni al midollo spinale, sono stati osservati profondi cambiamenti nel profilo di espressione spazio-temporale di questo recettore a partire dal sito della lesione: il GPR17 funziona infatti come "sensore" attivato dal danno, inducendo, nelle prime fasi, la morte cellulare nel *core* della lesione, e promuovendo, in tempi successivi, processi riparativi e di ripresa della funzione tissutale.

Studi recenti dimostrano che l'espressione del GPR17 aumenta durante il differenziamento degli OPC a pre-oligodendrociti, e si riduce successivamente durante la transizione a cellule mature, producenti mielina; a stadi avanzati di differenziamento sembra essere necessaria una drastica diminuzione dell'espressione del recettore GPR17 affinché le cellule possano completare la maturazione. Sulla base di questi dati è stato presupposto che, affinché si completi la maturazione dei pre-oligodendrociti, questo GPCR debba andare incontro a fenomeni di desensitizzazione (ovvero perdita della funzionalità in seguito a stimolazione prolungata del recettore), internalizzazione e down-regulation. In cellule di astrocitoma (1321N1) trasfettate con il GPR17 umano, è stato inoltre dimostrato che, dopo stimolazione con agonisti purinergici e leucotrienici, il recettore va incontro a desensitizzazione e internalizzazione in maniera tempo e concentrazione dipendente.

La desensitizzazione di un GPCR implica, in genere, la fosforilazione del recettore su residui amminoacidici conservati, come serina e treonina, ad opera di chinasi specifiche, (dette GRK) e la conseguente internalizzazione del complesso recettore-ligando. Questo processo va ad aumentare l'affinità del recettore per una proteina citoplasmatica, denominata β -arrestina, che, una volta legata al recettore fosforilato, ne permette l'internalizzazione.

Tra le diverse GRK, il ruolo centrale della GRK2 in molti pathway cellulari, suggerisce che l'alterata espressione di questa proteina e/o la sua attività possano avere importanti effetti sulle vie di segnale intracellulari. Da studi precedenti è emerso che nei leucociti di pazienti affetti da sclerosi multipla (SM), i livelli di GRK2 erano significativamente ridotti, facendo ipotizzare che

cambiamenti nell'espressione della GRK2 possano contribuire alla patogenesi della sclerosi multipla.

Su queste basi, l'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di studiare il ruolo delle GRK, in particolare della GRK2, nei processi di desensitizzazione del GPR17, per far luce sui meccanismi di regolazione del recettore durante la maturazione degli oligodendrociti. A tale scopo sono state utilizzate cellule 1321N1 stabilmente trasfettate con il recettore umano.

Mediante tecniche di immunoprecipitazione e Western Blot abbiamo valutato i livelli di fosforilazione del recettore GPR17 su residui di serina e treonina dopo attivazione con ligandi purinergici e leucotrienici. Utilizzando un anticorpo specifico per GPR17, abbiamo immunoprecipitato il recettore e eseguito un western blot per residui di treonina e serina fosforilati. I risultati ottenuti hanno dimostrato che dopo trattamento per vari tempi (da 5 a 90 min) con UDP-glucosio o LTD₄, il GPR17 viene fosforilato su residui di treonina, e, in misura minore, su residui di serina. Dopo trattamento prolungato con gli agonisti (UDP-glucosio o LTD₄ per 90 minuti) e successivo wash-out di due ore (tempo necessario per permettere il riciclo del recettore su membrana), la fosforilazione del GPR17 ritorna ai livelli basali. Questo suggerisce che la fosforilazione è un evento cruciale nel processo di desensitizzazione del GPR17.

Poiché per svolgere la propria azione le GRK devono essere reclutate sulla membrana, è stata in seguito valutata la traslocazione della GRK2 dal citosol alla membrana, dopo stimolazione del GPR17 con UDP-glucosio (100 µM) e LTD₄ (100 nM) per 5 minuti. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la GRK2 trasloca su membrana (effetto più evidente a seguito di stimolazione con LTD₄), suggerendo che tale chinasi possa essere implicata nei processi di fosforilazione e desensitizzazione del recettore GPR17.

Immunoprecipitando il recettore GPR17 e facendo un western blot per GRK2, abbiamo poi dimostrato che la GRK2 associa fisicamente con il GPR17 in seguito a stimolazione con LTD₄; tale associazione risulta invece debole dopo stimolazione con l'agonista purinergico UDP-glucosio.

Per avvalorare il ruolo della GRK2 nei processi di fosforilazione del GPR17, abbiamo "spento" la GRK2 tramite l'utilizzo di small interference RNA (siRNA) e saggiato nuovamente la fosforilazione del recettore. In cellule trattate con siRNA GRK2 abbiamo dimostrato che, mentre la fosforilazione indotta da LTD₄ diminuisce drasticamente, quella indotta da UDP-glucosio permane. Tali dati suggeriscono che durante la desensitizzazione del GPR17 indotta da LTD₄, la GRK2 risulta essere implicata, mentre nella desensitizzazione indotta da UDP-glucosio sembra non avere un ruolo protagonista (facendo presupporre il coinvolgimento di altre chinasi).